

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

脳21 (2013.10) 16(4):396-402.

Cuprizone誘発性脱髄モデル動物における脱髄と再ミエリン化

田中 達英

脱髓の病態生理

Cuprizone 誘発性脱髓モデル動物における脱髓と再ミエリン化

た なかたつひで 旭川医科大学 解剖学講座 機能形態学分野 (〒078-8510 北海道旭川市緑が丘東2-1-1)
 田中達英 E-mail : ttanaka@asahikawa-med. ac. jp

SUMMARY

脱髓疾患は神経軸索を取り囲むミエリンが破壊する疾患であり、中枢神経系では多発性硬化症 (MS) がその代表例である。MS の発症には遺伝および環境要因の両者が関わっているが、詳細な発症機序はいまだ不明である。MS の病因解明や治療法の開発を進めるうえで、その動物実験モデルの研究は極めて重要であるが、それぞれのモデルには一長一短があり、どのモデルが最適であるとはいえない。MS の研究を進めるためにはヒトと動物との間にみられる類似点と相違点を明確に把握したうえで利用することが望ましい。本稿では toxic demyelination model の一つである cuprizone 誘発性脱髓モデルにおける脱髓機序やグリア細胞の役割について概説し、このモデルを用いた MS の病因や再ミエリン化機序の解明に向けた取り組みや最近の知見を紹介する。

はじめに

神経細胞の軸索を取り巻くミエリンが崩壊する疾患を一般的に脱髓疾患とよぶ。脱髓を起こしたミエリンが自然に修復して再生できれば神経機能は正常に戻るが、脱髓が重篤であれば神経線維まで損傷を受けることになる。この脱髓病変は身体のさまざまな領域で起こり、病巣の部位により症状は異なる。中枢神経系脱髓疾患の中で多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) が最も多くみられる。MS の根本的な病因はいまだ不明であるが、その発症には複数の遺伝因子と環境因子が関わっていると考えられる。MS における詳細な病因・病態、診断方法などはこの特集の他稿に譲り、本稿では、MS の動物モデルとしての cuprizone 誘発性脱髓モデルマウスからみた脱髓と再ミエリン化について概説する。

I. 多発性硬化症について

MS の脱髓病変は中枢神経に限られ、病巣の形状は多様であり、病変部位も解剖学的な特異性を示さず、かつ経時的に不規則な再発と寛解を示す。19 世紀半ばに、中枢神経に散在性に硬化性病変が存在する疾患として知られるようになり、その疾患概念が組織病理学的に炎症性脱髓とグリオーシスで特徴づけられてか

KEY WORDS

脱髓
 cuprizone
 再ミエリン化
 多発性硬化症
 ミクログリア

ら140年経過しているが、いまだに病因は不明である¹⁾。進行性の場合、脱髄を起こした神経は軸索が退縮し、神経変性へと至る。現在、いくつかの対症療法は存在しており、急性期の病期を短縮できることは示されているが、再発予防や長期の神経学的な予後改善に関する効果は認められておらず、根治療法は存在しない。そのため最近では、MS患者が多い欧米において脱髄によって生じた神経障害を積極的に回復させる治療法、すなわちミエリンの再生療法の開発にも重点がおかれている。

II. 多発性硬化症の動物実験モデル

MSの病因を知るうえで、その動物実験モデルの研究は極めて重要である。MSのモデルとしていくつかの方法が知られている²⁾。最もよく用いられるのが実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE)であり、これはmyelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)などのペプチドを免疫することで誘導される自己免疫モデルである。EAEの発症機序は、末梢で活性化されたT細胞が中枢神経系に浸潤してさまざまなサイトカインやケモカインの産生を介してマクロファージやミクログリアが活性化して脱髄が誘導されると考えられている。EAEの詳細な発症機序や病態は板東の項を参照されたい。

EAE以外の脱髄モデルとしては、cuprizoneやlyssolecithin, ethidium bromideによる脱髄があげられる。これらは試薬を用いて脱髄を誘導させることから、“toxic demyelination model”とよばれる。toxic demyelination modelはオリゴデンドロサイトを死滅させて脱髄を誘導させるものであり、toxinを除去すれば速やかに再ミエリン化を誘導することができることが特徴でもある。本稿では、toxic demyelination modelの中でも比較的よく汎用されるcuprizone誘発性脱髄モデルについて概説する。

その他の脱髄モデルとしてタイラー脳脊髄炎ウイルス(Theiler's murine encephalomyelitis virus : TMEV)やセムリキ森林熱ウイルスを用いたウイルスモデルがある³⁾。TMEVは自然宿主のマウスに急性脳脊髄炎を起こす急性亜群と慢性脊髄炎を起こす慢

性亜群の二つに大別されており、後者は脊髄に持続感染し、単核球浸潤を伴った脱髄が誘導されるため、MSの動物モデルとして注目されている。

MSの病因解明や治療法の開発において動物実験モデルは重要であるが、それぞれのモデルには長所と短所があり、どのモデルが最適であるとはいえない。MSにおいて空間的および時間的に多発する脱髄をこれらのモデルでは正確に捉えることができないからである。動物モデルはあくまでモデルであって、真のヒトのMSを正確に反映しているわけではないが、侵襲的処置が可能、対照群を置くことが可能、障害程度の統御が可能という観点において動物実験モデルを用いた研究は必須である。MSの研究を進めるうえで、ヒトと動物との間にみられる類似点と相違点を明確に把握したうえで利用することが望ましい。

III. cuprizone による脱髄機序

銅のキレーターであるcuprizone(bis-cyclohexanone-oxaldihydrazone)を経口投与すると、銅の欠乏によりミトコンドリアの機能が低下し、オリゴデンドロサイトの代謝や細胞機能が低下した結果、脳の白質である脳梁で脱髄がもたらされる。しかし、銅の欠乏によってなぜオリゴデンドロサイトのみが障害を受けるのか、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。考えられる理由としては、オリゴデンドロサイトは広範囲におよぶミエリンを維持しなければならず、cuprizoneによる代謝障害がオリゴデンドロサイトにとって致命的であることとあげられる。Komolyらはcuprizoneによってミトコンドリアの機能が障害され、オリゴデンドロサイト内の酵素活性やpHが乱れた結果、ミエリンの膜から水やイオンの出入りを調節してミエリンのコンパクションに寄与している炭酸脱水素酵素IIが機能しなくなるためと考えている^{4,5)}。

cuprizoneを用いた脱髄モデルとして最初に報告されたのは1960年代である^{6,7)}。これまでの研究により、cuprizoneによる脱髄はC57BL/6, Swiss, ICIやSJJLマウスなどで報告があり、特にC57BL/6マウスがよく用いられる。C57BL/6マウスでは0.2~0.3%濃度のcuprizoneがよく汎用されるのに対して、SwissマウスやICIマウスでは0.5~0.6%濃度で使われる場合

が多い⁸⁾。また, SJL マウスでは C57BL/6 とは異なり, 脳梁において脱髄は起こるものの正中部分は脱髄が起こらないと報告されている⁹⁾。さらにマウスやラットの週齢によっても脱髄の進行過程は異なる。C57BL/6 マウスにおいて4週齢マウスでは cuprizone による感受性が高く, しばしば致命的となる。これに対して6ヵ月齢マウスでは効果的に脱髄を誘導することができない。このことから現在, C57BL/6 マウスでは6~9週齢マウスで0.2~0.3% cuprizone がよく用いられている。

8週齢の C57BL/6 マウスにおいて0.2% cuprizone を投与すると3週間後から Luxol fast blue (LFB) 染色や電子顕微鏡での観察により顕著な脱髄が確認できる。また, ミエリン因子である myelin basic protein (MBP) や proteolipid protein (PLP), 成熟オリゴデンドロサイトのマーカーである CC1 や GST-pi の抗体での免疫組織化学染色によっても脱髄を検出することができる。興味深いことに cuprizone 投与5週を過ぎ

るとさらなる脱髄は観察されず, むしろ自発的な再ミエリン化がみられる。ただ, その後も cuprizone を投与し続けると再び脱髄状態になる。このことから, 自発的な再ミエリン化が部分的に観察される6週目までの脱髄を“acute demyelination”, 自発的な再ミエリン化を経て再び起こる長期的な脱髄を“chronic demyelination”として区別される(図1)。

cuprizone による脱髄部位は脳梁と上小脳脚が報告されている¹⁰⁾。しかしながら, 脳梁でも cuprizone によって脱髄の影響を受ける部位が多少異なる。脳梁膨大部では脱髄が顕著に誘導されるが, 脳梁膝ではわずかしき脱髄が起こらない。また, 最近では cuprizone により大脳皮質でも脱髄が誘導されることが報告されている¹¹⁾。

ここまで cuprizone 誘発性の脱髄について言及したが, この cuprizone を用いた脱髄モデルの特徴として, 自然経過ではほぼ完全なミエリン再生が観察できる点があげられる。つまり, cuprizone による脱髄後, 飼料

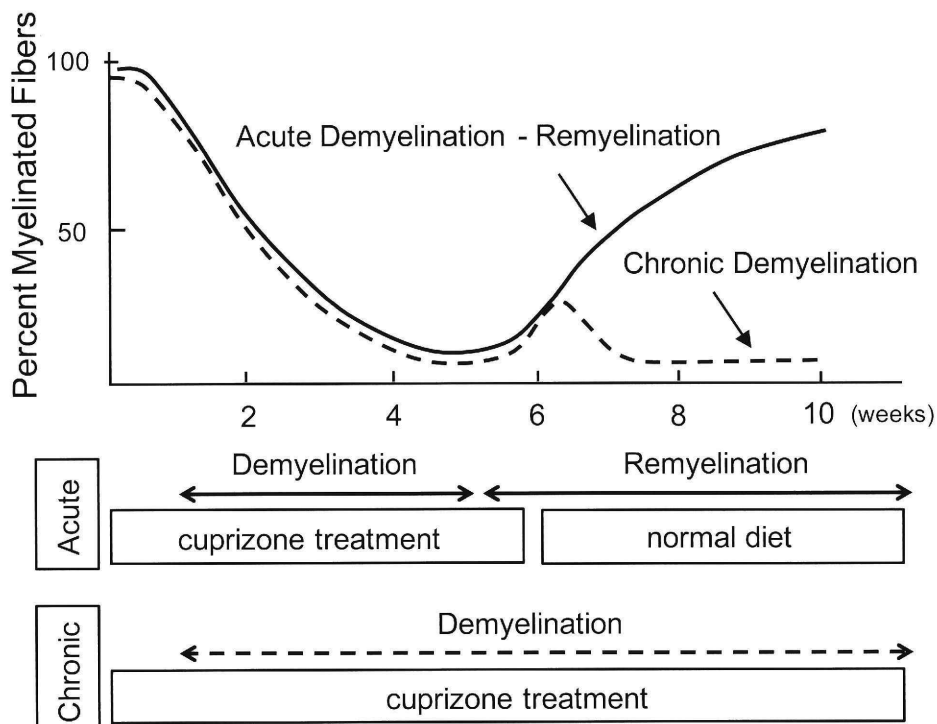


図1 脳梁における cuprizone 誘発性脱髄の経時変化

実線は cuprizone 投与6週の後, 通常の餌に戻した時の髄鞘化された神経線維の割合を示し, 波線は cuprizone の連続投与時の髄鞘化された神経線維の割合を示す。自発的な再ミエリン化が部分的に観察される6週までの脱髄を“acute demyelination”, 自発的な再ミエリン化を経た長期的な脱髄を“chronic demyelination”として区別する。

から cuprizone を除去するだけで脱髄部位の再ミエリン化が誘導される。前述したように、MS に対する根治療法は存在しない。しかしながら、MS における症状の寛解は脱髄巣の再ミエリン化によることから、生体内において再ミエリン化が起こることは間違いないが、脱髄後の再ミエリン化能は必ずしも高くはない。現在、このミエリン再生能の低下はオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) からオリゴデンドロサイトの分化障害が原因と考えられている¹²⁾。一方で、cuprizone を用いたモデルではほぼ完全なミエリン再生が認められることから、生体内における元来のミエリン再生能自体は高いと考えられる。したがってこのモデルによって脱髄後にミエリンを積極的に再生させる分子機序を解明できる可能性がある。

IV. cuprizone 誘発性脱髄モデルにおけるミクログリアとアストロサイトの役割

cuprizone による脱髄過程において脱髄部位である脳梁にミクログリアおよびアストロサイトの集積が観察される^{8,13)}。著者らのモデルでも 0.2% cuprizone 投与後 2 週からミクログリアおよびアストロサイトの集積が認められ、脱髄がピークとなる 4 週で脳梁におけるミクログリアおよびアストロサイトの数も最も増大する (図 2)。では、これらの細胞の役割は何であろうか? cuprizone はオリゴデンドロサイトを特異的に死滅させ、その結果として脱髄が起こることから考えて、脳梁に集積してくるミクログリアおよびアストロサイトが脱髄の進行に直接的な影響を与えていることは考えにくい。しかしながら、脱髄部位に遊走してくるミクログリアおよびアストロサイトから TNF- α 、IL-1 β や一酸化窒素 (NO) などのさまざまな炎症性サイトカインが放出されることを考慮すると、これらの炎症性サイトカインが二次的な脱髄に関与しているのかもしれない^{14,15)}。

一方で、ミクログリアおよびアストロサイトが再ミエリン化に寄与するという報告もある。著者らは cuprizone による脱髄後に再ミエリン化を誘導しても脳梁に集積していたミクログリアの数がそれほど減少しないことに着目し、活性化ミクログリアがミエリン再生にどのような影響をおよぼしているのかを検討した¹³⁾。再ミエリン化過程においてミクログリアの活

性を薬剤 (ミノサイクリン) で阻害するとミエリン再生が抑制することから、ミクログリアがミエリンの再生に積極的に寄与しているものと思われる。通常、ミエリンを形成するためには OPC が分化を遂げて成熟オリゴデンドロサイトになる必要がある。その際、Olig1 や Olig2, Nkx2.2 などの細胞内制御因子に加えて分化誘導因子としての細胞外制御因子も必須であることが明らかにされている¹⁶⁾。著者らは再ミエリン化過程において細胞外制御因子としてミクログリアから CNTF が産生され、直接オリゴデンドロサイトの分化に働いていることを明らかにした¹³⁾。

また、最近になり cuprizone を用いた脱髄後の再ミエリン化過程におけるアストロサイトの機能として興味深い報告がなされた¹⁷⁾。障害されたミエリンはミクログリアによって貪食されるが、活性化ミクログリアの脳梁への遊走を制御しているのはアストロサイトが発現するケモカイン、CXCL10 であるというものである。この論文では、アストロサイトは脱髄の形成には関与せず、再ミエリン化に対する機能について言及している。このほかにも脱髄に伴って遊走してくるミクログリアやアストロサイトから FGF-2 や IGF-1, LIF, HGF などが時間的に異なるタイミングで産生され、これらの因子群の制御ネットワークがミエリン再生に必要であると報告されている¹⁴⁾ (カラーグラビア p.10, 図 4 参照)。

V. cuprizone 誘発性脱髄モデルの MS 病因解明へのアプローチ

MS では Th1 細胞やマクロファージなどの免疫細胞が血液脳関門を通過して脳実質内に浸潤する。脳に定住するミクログリアと浸潤したマクロファージとともに Th1 細胞に抗原を提示し、活性化を受けたこれらの細胞は細胞傷害性因子を放出してミエリンを攻撃すると考えられている。cuprizone 誘発性脱髄モデルでは血液脳関門が破綻されないため末梢からの Th1 細胞やマクロファージ浸潤が起こらない⁸⁾。このことから、cuprizone 誘発性脱髄モデルは MS の症状を正確に捉えたモデルとはいえない。では、このモデルを用いて MS の病因解明に近づくアプローチはできないのだろうか? 著者は可能であると考え、2004 年に MS の発症機序に関する興味深い報告がなされた。脳

幹に脱髄巣が生じ、MS 発症後、早期に死亡した患者の脱髄巣には自己免疫説の根幹となる T 細胞やマクロファージの浸潤はほとんどないにもかかわらず、オリゴデンドロサイトの細胞死がみられると報告され

た¹⁸⁾。これまで脱髄の原因と考えられてきた炎症反応が、実はオリゴデンドロサイトが障害を受けることで起こり、その炎症反応がミエリン再生を起こすために必要である可能性が指摘された。すべてではないに

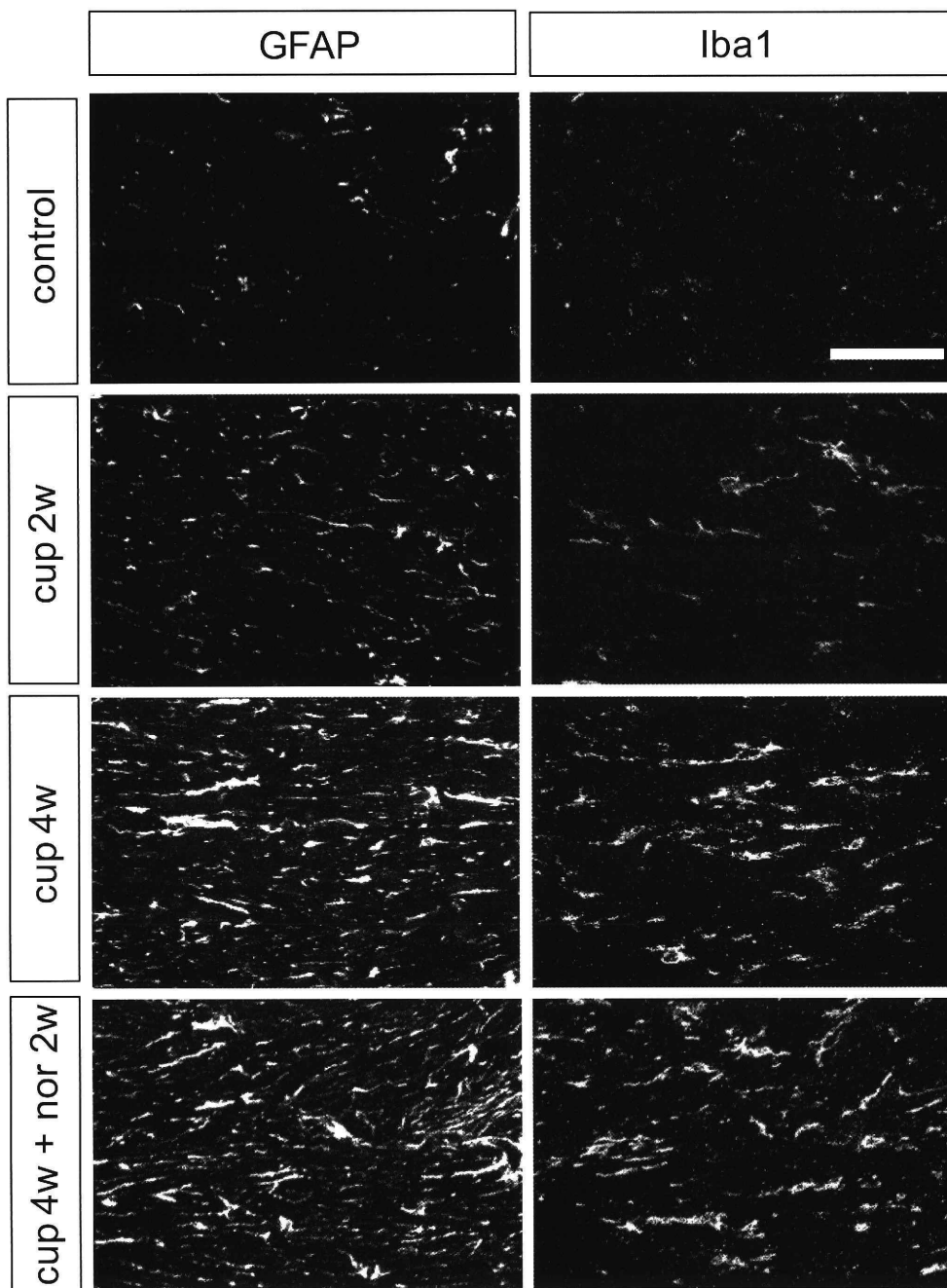


図2 cuprizone 誘発性脱髄とともに観察されるミクログリアおよびアストロサイトの集積
 左はアストロサイトのマーカー、GFAP を示し、右はミクログリアのマーカー、Iba1 を示す。顕著な脱髄が観察される4週目で脳梁におけるミクログリアおよびアストロサイトの数が最も増大する。
 cup; cuprizone, nor; normal diet. スケールバー 50 μm. (カラーグラビア p.9, 図3参照)

しろ、MS 発症機序のいくらかはこのように炎症反応に先立ってオリゴデンドロサイトの細胞死が起こる¹⁹⁾。cuprizone 誘発性の脱髄モデルではオリゴデンドロサイトの細胞死に続いてミクログリアまたはアストロサイトからさまざまな炎症性サイトカインが産生されるが、このことは脱髄後の炎症反応は必要であるという概念を支持している。事実、Arnett らは TNF- α KO マウスと cuprizone 誘発性脱髄モデルを組み合わせた実験から、炎症性サイトカインである TNF- α が OPC の増殖と再ミエリン化を促進することを示している²⁰⁾。一方、cuprizone 誘発性脱髄モデルにおいても炎症性サイトカインが脱髄の進行に関与する報告があることも付け加えておく¹⁵⁾。

Lucchinetti らは、病理学的機序により MS 病変には四つのパターンがあることを報告している²¹⁾。すなわち、T 細胞とマクロファージが浸潤している第 1 パターン、免疫グロブリンと補体が沈着している第 2 パターン、オリゴデンドロサイトのアポトーシスがあるものの免疫グロブリンや補体が欠如している第 3 パターン、そしてオリゴデンドロサイトのジストロフィーである第 4 パターンである。この病理学的分類によれば、MS のモデルとして汎用される EAE は第 1 および 2 パターンに相当する。一方、cuprizone による脱髄は第 3 および第 4 パターンに当てはまる。MS の第 3 および第 4 パターンに当てはまる病態に対しては cuprizone 誘発性脱髄モデルの適応が可能であり、このモデルから MS の病因解明に近づくアプローチができると著者は考えている。

おわりに

本稿では toxic demyelination model の一つとして cuprizone 誘発性脱髄モデルについて紹介した。cuprizone を用いたモデルでは脱髄後の再ミエリン化能が高いため、ミエリン再生療法のための分子機序解明には有用なツールといえるかもしれない。しかしながら、EAE を含むさまざまなモデルを用いた多角的な研究が多発性硬化症の病因や治療法の開発には必須である。MS 患者は長期にわたり神経障害に苦しんでいる。また、一時は症状が和らいでいてもいつ新たな症状が出現するのかを予見することは不可能であるた

め、不安な日々を過ごしている。新たな治療を待ち望む人のためにも MS の詳細な病因やミエリン再生メカニズムの解明が待たれる。

参考文献

- 1) Itoyama Y : What I have learned and accomplished through research on multiple sclerosis (MS). *Clin Neurol* **49** : 699-707, 2009.
- 2) Denic A, et al : The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology* **18** : 21-29, 2011.
- 3) van der Star BJ, et al : In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **11** : 570-588, 2012.
- 4) Kida E, et al : Carbonic anhydrase II in the developing and adult human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* **65** : 664-674, 2006.
- 5) Komoly S, et al : Decrease in oligodendrocyte carbonic anhydrase activity preceding myelin degeneration in cuprizone induced demyelination. *J Neurol Sci* **79** : 141-148, 1987.
- 6) Carlton WW : Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone. *Toxicol Appl Pharmacol* **8** : 512-521, 1966.
- 7) Carlton WW : Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Sci* **6** : 11-19, 1967.
- 8) Matsushima GK, Morell P : The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol* **11** : 107-116, 2001.
- 9) Taylor LC, et al : SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. *Brain Pathol* **19** : 467-479, 2009.
- 10) Torkildsen O, et al : The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand* **188** Suppl : 72-76, 2008.
- 11) Skripuletz T, et al : Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *Am J Pathol* **172** : 1053-1061, 2008.
- 12) Chang A, et al : NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci* **20** : 6404-6412, 2000.
- 13) Tanaka T, et al : Minocycline reduces remyelination by suppressing ciliary neurotrophic factor expression after cuprizone-induced demyelination. *J Neurochem in press*.
- 14) Gudi V, et al : Spatial and temporal profiles of growth factor expression during CNS demyelination reveal the

- dynamics of repair priming. PLoS One **6** : e22623, 2011.
- 15) Pasquini LA, et al : The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. Neurochem Res **32** : 279-292, 2007.
 - 16) Kondo T : Common mechanism underlying oligodendrocyte development and oligodendroglioneogenesis. Brain Nerve **61** : 741-751, 2009.
 - 17) Skripuletz T, et al : Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination. Brain **136** : 147-167, 2013.
 - 18) Barnett MH, Prineas JW : Relapsing and remitting multiple sclerosis : pathology of the newly forming lesion. Ann Neurol **55** : 458-468, 2004.
 - 19) Lassmann H : Multiple sclerosis : is there neurodegeneration independent from inflammation? J Neurol Sci **259** : 3-6, 2007.
 - 20) Arnett HA, et al : TNF promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. Nat Neurosci **4** : 1116-1122, 2001.
 - 21) Lucchinetti C, et al : Heterogeneity of multiple sclerosis lesions : implications for the pathogenesis of demyelination. Ann Neurol **47** : 707-717, 2000.

子どものこころと脳の発達

The Journal of Child & Brain Development

Vol. 4 No. 1 (2013年7月)

特集 発達研究センターの活動紹介

A4変型判・80頁 定価 1,890円(本体 1,800円+税5%) ISBN978-4-7653-1580-7

Vol. 3 No. 2 (2012年12月)

連合大学院5大学化記念特集

特集1 福井校キックオフシンポジウム「自閉症のきょうだいにも目を向けよう」

特集2 千葉校キックオフシンポジウム「子どものメンタルヘルス」

A4変型判・50頁 定価 1,890円(本体 1,800円+税5%) ISBN978-4-7653-1550-0

Vol. 3 No. 1 (2012年5月)

特集 東日本大震災一被災地の子どもの支援

A4変型判・64頁 定価 1,890円(本体 1,800円+税5%) ISBN978-4-7653-1522-7

Vol. 2 No. 1 (2011年9月)

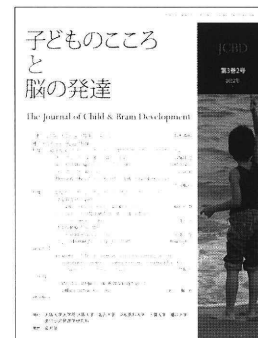
特集 子どもの虐待と脳の発達

A4変型判・69頁 定価 1,890円(本体 1,800円+税5%) ISBN978-4-7653-1496-1

Vol. 1 No. 1 (2010年6月)

特集 連合小児発達学研究科開設記念特集

A4変型判・92頁 定価 1,890円(本体 1,800円+税5%) ISBN978-4-7653-1435-0



発行 大阪大学大学院 大阪大学・金沢大学・浜松医科大学・千葉大学・福井大学連合小児発達学研究科
発売 金芳堂

株式会社 金芳堂

京都市左京区鹿ヶ谷西寺ノ前町 34 番地 〒606-8425
Tel 075-751-1111 Fax 075-751-6858

E-mail(営業部): eigyo@kinpodo-pub.co.jp
http://www.kinpodo-pub.co.jp/